

Instruções de uso

RealStar[®] Norovirus RT-PCR Kit 2.0

01/2017 PT

RealStar®

Norovirus RT-PCR Kit 2.0

Para utilização com

m2000rt (Abbott Diagnostics)

Mx 3005P™ QPCR System (Stratagene)

VERSANT® kPCR Molecular System AD (Siemens Healthcare)

ABI Prism® 7500 SDS (Applied Biosystems)

ABI Prism® 7500 Fast SDS (Applied Biosystems)

Rotor-Gene® 6000 (Corbett Research)

Rotor-Gene® Q5/6 plex Platform (QIAGEN)

LightCycler® 480 Instrument II (Roche)



052013

96

01 2017

altona Diagnostics GmbH • Mörkenstr. 12 • D-22767 Hamburg

Conteúdo

1. Utilização Prevista	6
2. Componentes do Kit	6
3. Armazenamento	6
4. Materiais e Dispositivos requeridos mas não fornecidos.....	7
5. Informação de Base	8
6. Descrição do Produto.....	9
6.1 Instrumento de PCR em tempo real.....	10
7. Avisos e Precauções	11
8. Procedimento	12
8.1 Preparação de Amostras.....	12
8.2 Preparação da Master Mix.....	13
8.3 Preparação da Reação	15
9. Programação dos instrumentos de PCR em tempo real.....	16
9.1 Definições	16
9.2 Detetores de fluorescência (corantes)	16
9.3 Perfil de Temperatura e Aquisição de Corante.....	17
10. Análise de Dados	18
10.1 Validade dos Processamentos do Teste de Diagnóstico.....	18
10.1.1 Processamento de Teste de Diagnóstico Válido.....	18
10.1.2 Processamento de Teste de Diagnóstico Inválido	19
10.2 Interpretação dos Resultados	19
10.2.1 Análise Qualitativa	19

11. Avaliação do Desempenho.....	20
11.1 Sensibilidade Analítica	20
11.2 Especificidade Analítica	21
11.3 Precisão	22
11.4 Avaliação Diagnóstica	24
12. Limitações	25
13. Controlo de Qualidade.....	26
14. Apoio Técnico	26
15. Bibliografia	26
16. Marcas Comerciais e Isenções de Responsabilidade	27
17. Explicação de Símbolos	28

1. Utilização Prevista

O RealStar® Norovirus RT-PCR Kit 2.0 é um teste de diagnóstico *in vitro* baseado na tecnologia de PCR em tempo real para a deteção qualitativa do ARN específico para norovírus pertencentes ao genogrupo I (G I) e genogrupo II (G II). Além disso, o teste permite a diferenciação entre o ARN do norovírus do genogrupo I e norovírus do genogrupo II.

2. Componentes do Kit

Cor cobertura	Componente	Número de frascos	Volume [µl/tubo]
Azul	Master A	4	120
Violeta	Master B	4	360
Verde	Internal Control	1	1000
Vermelho	Positive Control G I	1	125
Laranja	Positive Control G II	1	125
Branco	Water (PCR grade)	1	500

Internal Control = Controle interno

Positive Control = Controle positivo

Water (PCR grade) = Água de PCR

3. Armazenamento

- O RealStar® Norovirus RT-PCR Kit 2.0 é enviado em gelo seco. Os componentes do kit devem chegar congelados. Se um ou mais componentes não estiverem congelados no momento da recepção, ou se algum tubo tiver ficado comprometido durante o envio, contacte a Altona Diagnostics GmbH para obter assistência.
- Todos os componentes devem ser conservados entre -25 °C e 15 °C depois do momento da entrega.
- Deve-se evitar o congelamento e descongelamento repetido de reagentes Master (mais do que duas vezes), pois isto poderá afetar o desempenho do

ensaio. Os reagentes devem ser congelados em alíquotas se a sua utilização prevista for intermitente.

- O armazenamento entre +2 °C e +8 °C não deve exceder um período de duas horas.
- Proteger o Master A e o Master B da luz.

4. Materiais e Dispositivos requeridos mas não fornecidos

- Instrumento de PCR em tempo real adequado (consulte o capítulo 6.1. Instrumentos de PCR em tempo real)
- Sistema ou kit de extração de ácido nucleico adequado
- Centrífuga de bancada com um rotor para tubos de reação de 2 ml
- Centrífuga com um rotor para placas de microtitulação, aquando da utilização de placas de reação com 96 poços
- Agitador vortex
- Placas de reação com 96 poços ou tubos de reação adequados com material de fecho (óticos) correspondente
- Pipetas (ajustáveis)
- Pontas de pipeta com filtros (descartáveis)
- Luvas sem pó (descartáveis)

NOTA



Certifique-se de que todos os instrumentos utilizados foram instalados, calibrados, verificados e mantidos de acordo com as instruções e recomendações do fabricante.



É altamente recomendada a utilização do rotor de 72 poços com tubos de reação de 0,1 ml adequados, se utilizando o Rotor-Gene® 6000 (Corbett Research) ou o Rotor-Gene® Q 5/6 plex (QIAGEN).

5. Informação de Base

O género *Norovirus* (norovírus) pertence à família *Caliciviridae* e era anteriormente conhecido como o *vírus tipo Norwalk*. Os norovírus são vírus ARN de cadeia simples, descobertos em 1972 através de microscopia eletrónica. São caracterizados pelo seu elevado grau de variabilidade genómica. Os norovírus foram classificados em cinco genogrupos (G I a G V) com base na sequência em comparação com a polimerase de ARN e capsídeo da região do genoma. Os genogrupos I, II e IV são associados a infeções em humanos. Até à data, os genogrupos G I e G II são subdivididos em pelo menos 8 e 17 genótipos, respetivamente.

Os norovírus são responsáveis pela maioria das gastroenterites agudas não bacteriana em humanos em países industrializados. Os sintomas como vómitos e diarreia podem ocorrer após um curto período de incubação de 8 a 72 horas. Os norovírus são altamente infecciosos. As infeções com norovírus podem ser causadas tanto por água potável e/ou alimentos contaminados, como pela transmissão do vírus entre pessoas. Os norovírus podem causar situações de grandes surtos em contextos de estreito contacto humano, tal como em hospitais, lares, navios de cruzeiro, etc.

Nos últimos anos, foi comunicado um aumento substancial de surtos do norovírus na Europa Ocidental. Para evitar uma maior propagação do agente responsável durante uma situação de surto, é necessária uma aplicação imediata de medidas de higiene, assim como diagnósticos rápidos e sensíveis. Visto que o norovírus dos genogrupos I e II não pode ser cultivado em culturas de células e, dado que os imunoenaios foram considerados insuficientemente sensíveis e/ou específicos, a RT-PCR tornou-se o método de eleição para o diagnóstico de infeções por norovírus.

NOTA



Devido à formação molecular relativamente rápida e aos vírus ARN, existe um risco inerente relativamente a qualquer sistema de teste baseado em RT-PCR de a acumulação de mutações ao longo do tempo poder resultar em resultados falsos negativos.

6. Descrição do Produto

O RealStar® Norovirus RT-PCR Kit 2.0 é um teste de diagnóstico *in vitro* baseado na tecnologia de PCR em tempo real para a deteção qualitativa e diferenciação do norovírus do genogrupos I e o ARN específico do norovírus do genogrupos II. O ensaio inclui um sistema de amplificação heteróloga (Controlo Interno) para identificar possíveis inibições da RT-PCR e para confirmar a integridade dos reagentes do kit.

A tecnologia de RT-PCR em tempo real utiliza uma reação da transcriptase reversa (RT) para converter ARN em ADN complementar (ADNc), reação em cadeia da polimerase (PCR) para a amplificação de sequências alvo específicas e de sondas alvo específicas para a deteção de ADN amplificado. As sondas estão marcadas com repórter fluorescente e corante quencher.

As sondas específicas para NV G I ARN estão marcadas com o fluoróforo Cy⁵, ao passo que as sondas específicas para NV G II ARN estão marcadas com o fluoróforo FAMTM. A sonda específica para o Controlo Interno está marcada com o fluoróforo JOETM.

A utilização de sondas associada a colorações distinguíveis permite a deteção paralela do NV G I e ARN específico do NV G II, assim como do Controlo Interno nos canais de deteção correspondentes do instrumento de PCR em tempo real.

O teste consiste em três processos num único tubo de ensaio:

- Transcriptase reversa do ARN para ADNc alvo e do Controlo interno
- Amplificação de PCR do ADNc alvo e do Controlo Interno
- Deteção simultânea de amplicões de PCR por sondas marcadas com corante fluorescente

O RealStar® Norovirus RT-PCR Kit 2.0 consiste em:

- Dois reagentes Master (Master A e Master B)
- Controlo Interno
- Dois Controlos Positivos:
 - Controlo Positivo NV G I
 - Controlo Positivo NV G II
- Água de grau PCR

Os reagentes Master A e Master B contêm todos os componentes (tampão de PCR, transcriptase reversa, ADN polimerase, primers e sondas) necessários para permitir a transcriptase reversa, a amplificação mediada por PCR e a deteção de alvos do ARN específico do NV G I e NV G II, assim como do Controlo Interno numa preparação de reação.

6.1 Instrumento de PCR em tempo real

O RealStar® Norovirus RT-PCR Kit 2.0 foi desenvolvido e validado para utilização com os seguintes instrumentos de PCR em tempo real:

- m2000rt (Abbott Diagnostics)
- Mx 3005P™ QPCR System (Stratagene)
- VERSANT® kPCR Molecular System AD (Siemens Healthcare)
- ABI Prism® 7500 SDS (Applied Biosystems)
- ABI Prism® 7500 Fast SDS (Applied Biosystems)
- Rotor-Gene® 6000 (Corbett Research)
- Rotor-Gene® Q5/6 plex Platform (QIAGEN)
- LightCycler® 480 Instrument II (Roche)

7. Avisos e Precauções

Leia as instruções de utilização cuidadosamente antes de utilizar o produto.

- Antes da primeira utilização, verifique o produto e os seus componentes relativamente a:
 - Integridade
 - Totalidade no que diz respeito ao número, tipo e conteúdos (consulte o capítulo 2. Componentes do Kit)
 - Rotulagem correta
 - Congelado aquando o momento da entrega
- A utilização deste produto está limitada a pessoal especialmente instruído e formado em técnicas de PCR em tempo real e procedimentos de diagnósticos *in vitro*.
- Os espécimes devem ser sempre tratados como sendo infecciosos e/ou nocivo, segundo os procedimentos laboratoriais de segurança.
- Utilize luvas protetoras descartáveis sem pó, uma bata de laboratório e proteção ocular quando manusear as amostras.
- Evite contaminação microbiana e por nuclease (DNase/RNase) dos espécimes e dos componentes do kit.
- Utilize sempre pontas de pipeta descartáveis sem DNase/RNase, com barreiras de aerossóis.
- Use sempre luvas protetoras descartáveis sem pó quando manusear os componentes do kit.
- Utilize áreas de trabalho separadas e isoladas para (i) a preparação da amostra, (ii) a preparação da reação e (iii) as atividades de amplificação/deteção. A ordem das tarefas no laboratório deve ser unidirecional. Utilize sempre luvas descartáveis em cada área e troque-as antes de entrar numa área diferente.
- Selecione materiais e equipamentos específicos para cada área de trabalho individual e não os transfira de uma área para outra.

- Guarde o material positivo e/ou potencialmente positivo separado de todos os outros componentes do kit.
- Não abra os tubos/placas de reação pós-amplificação para evitar a contaminação com amplicões.
- Os controlos adicionais poderão ser testados segundo as diretrizes ou requisitos de regulamentações estatais e/ou federais ou organizações acreditadas.
- Não utilize a autoclave para os tubos de reação após a PCR, dado que não iria degradar o ácido nucleico amplificado e iria suportar o risco de contaminar a área de laboratório.
- Não utilize componentes do kit que tenham passado do prazo de validade.
- Deite fora os resíduos de amostras e ensaios respeitando as regulamentações de segurança locais.

8. Procedimento

8.1 Preparação de Amostras

O ARN extraído é o material inicial para o RealStar® Norovirus RT-PCR Kit 2.0.

A qualidade do ARN extraído tem um impacto profundo no desempenho de todo o sistema de teste. É necessário assegurar que o sistema utilizado para a extração de ácido nucleico é compatível com a tecnologia de PCR em tempo real. Os seguintes kits e sistemas são adequados para a extração de ácido nucleico:

- QIAamp® Viral RNA Mini Kit (QIAGEN)
- QIASymphony® (QIAGEN)
- NucliSENS® easyMag® (bioMérieux)
- MagNA Pure 96 System (Roche)
- m2000sp (Abbott)
- Maxwell® 16 IVD Instrument (Promega)
- VERSANT® kPCR Molecular System SP (Siemens Healthcare)

Os seguintes kits e sistemas de extração de ácido nucleico também podem ser adequados. A adequação do procedimento de extração de ácido nucleico para utilização com RealStar® Norovirus RT-PCR Kit 2.0 deve ser validada pelo utilizador.

No caso da utilização de um procedimento de preparação de amostras baseado numa coluna de centrifugação, incluindo tampões de lavagem contendo etanol, recomenda-se vivamente um passo de centrifugação adicional de 10 min. a aproximadamente 17 000 x g (~ 13 000 rpm), utilizando um tubo de colheita novo, antes da eluição do ácido nucleico.

ATENÇÃO



Se o seu sistema de preparação de amostras utilizar tampões de lavagem contendo etanol, certifique-se de que elimina quaisquer vestígios de etanol antes da eluição do ácido nucleico. O Etanol é um forte inibidor de PCR em tempo real.



A utilização de ARN transportador é crucial para a eficiência da extração e estabilidade do ácido nucleico.

Para obter informações adicionais e assistência técnica relativamente ao pré-tratamento e preparação de amostras, contacte o nosso Apoio Técnico (consulte o capítulo 14. Apoio Técnico).

8.2 Preparação da Master Mix

Todos os reagentes e amostras devem ser completamente descongelados, misturados (através de pipetagem ou por agitação ligeira em vortex) e centrifugados brevemente antes da utilização.

O RealStar® Norovirus RT-PCR Kit 2.0 contém um Controlo Interno heterólogo, que pode ser utilizado como um controlo de inibição de RT-PCR ou para controlar o procedimento de preparação de amostras (extração de ácido nucleico) e como um controlo de inibição de RT-PCR.

- ▶ Se o Controlo Interno for utilizado como um controlo de inibição de RT-PCR, mas não como um controlo para o procedimento de preparação de amostras, o Master Mix é configurado segundo o seguinte esquema de pipetagem:

Número de Reações (reações)	1	24
Master A	5 µl	120 µl
Master B	15 µl	360 µl
Controlo Interno (Internal Control)	0.5 µl	12 µl
Volume da Master Mix	20.5 µl	492 µl

- ▶ Se o Controlo Interno for utilizado para o procedimento de preparação de amostras e como um controlo de inibição de RT-PCR, adicione o Controlo Interno durante o procedimento de extração de ácido nucleico.
- ▶ Independentemente do método/sistema utilizado para a extração de ácido nucleico, o Controlo Interno **não deve** ser adicionado diretamente à amostra. O Controlo Interno deve ser sempre acrescentado à mistura de tampão de amostra/lise. O volume do Controlo Interno que deve ser adicionado depende sempre e apenas do volume da eluição. Este representa 10% do volume da eluição. Por exemplo, se o ácido nucleico vai ser eluído em 60 µl de tampão de eluição ou água, deve ser adicionado 6 µl de Controlo Interno por amostra à mistura de tampão de espécime/lise.
- ▶ Se o Controlo Interno for acrescentado durante o procedimento de preparação de amostras, o Master Mix é configurado segundo o seguinte esquema de pipetagem:

Número de Reações (reações)	1	24
Master A	5 µl	120 µl
Master B	15 µl	360 µl
Volume da Master Mix	20 µl	480 µl

ATENÇÃO

Se o Controlo Interno foi adicionado durante o procedimento de preparação da amostra, pelo menos o controlo negativo deve incluir o Controlo Interno



Independentemente do método/sistema utilizado para a extração de ácido nucleico, nunca adicione Controlo Interno diretamente ao espécime.

8.3 Preparação da Reação

- ▶ Pipete 20 µl da Master Mix para cada poço necessário de uma placa de reação ótica com 96 poços adequada ou um tubo de reação ótico adequado.
- ▶ Adicione 5 µl da amostra (eluato da extração de ácido nucleico) ou 5 µl do controlo (controlo positivo ou negativo).

Preparação da Reação	
Master Mix	20 µl
Controlo da Amostra	5 µl
Volume Total	25 µl

- ▶ Certifique-se de que são utilizados todos os controlos positivos e pelo menos um controlo negativo por processamento.
- ▶ Misture cuidadosamente as amostras e os controlos com a Master Mix através de pipetagem para cima e para baixo.
- ▶ Feche a placa de reação com 96 poços com as tampas adequadas ou uma película adesiva ótica e os tubos de reação adequados.
- ▶ Centrifugue a placa de reação com 96 poços numa centrífuga com rotor para placas de microtitulação durante 30 segundos a aproximadamente 1000 x g (~ 3000 rpm).

9. Programação dos instrumentos de PCR em tempo real

Para obter informações relativas à configuração e programação dos diferentes instrumentos de PCR em tempo real, consulte o manual do utilizador do respetivo instrumento.

Para obter instruções detalhadas relativamente à utilização do RealStar® Norovirus RT-PCR Kit 2.0 em instrumentos de PCR em tempo real específicos, contacte o nosso Apoio Técnico (consulte o capítulo 14. Apoio Técnico).

9.1 Definições

- Configure as seguintes definições:

Definições	
Volume de Reação	25 µl
Taxa de rampa	Predefinição
Referência Passiva	Nenhuma

9.2 Detetores de fluorescência (corantes)

- Defina os detetores de fluorescência (corantes):

Alvo	Nome do Detetor	Reporter	Quencher
ARN específico do NV G I	NV G I	Cy [®] 5	(Nenhum)
ARN específico do NV G II	NV G II	FAM™	(Nenhum)
Controlo Interno (Internal Control)	Controlo Interno	JOE™	(Nenhum)

9.3 Perfil de Temperatura e Aquisição de Corante

- Defina o perfil de temperatura e a aquisição de corante:

	Fase	Ciclo Repetições	Aquisição	Temperatura [°C]	Tempo [min: seg]
Transcriptase Reversa	Suspensão	1	-	50	10:00
Desnaturação	Suspensão	1	-	95	10:00
Amplificação	Realização de Ciclo	45	-	95	00:15
			sim	58	00:45

10. Análise de Dados

Para obter informações básicas relativas à análise de dados em instrumentos de PCR em tempo real, consulte o manual do utilizador do respetivo instrumento.

Para obter instruções detalhadas relativamente à análise dos dados gerados com o RealStar® Norovirus RT-PCR Kit 2.0 em diferentes instrumentos de PCR em tempo real, contacte o nosso Apoio Técnico (consulte o capítulo 14. Apoio Técnico).

10.1 Validade dos Processamentos do Teste de Diagnóstico

10.1.1 Processamento de Teste de Diagnóstico Válido

Para que um processamento de teste de diagnóstico seja **válido**, devem existir as seguintes condições de controlo:

ID do Controlo	Canal de Detecção		
	Cy ⁵	FAM TM	JOE TM
Controlo Positivo NV G I	+	-	+/-*
Controlo Positivo NV G II	-	+	+/-*
Controlo Negativo	-	-	+

* A presença ou ausência de um sinal no canal JOETM não é relevante para a validade do teste.

10.1.2 Processamento de Teste de Diagnóstico Inválido

Um processamento de teste de diagnóstico é **inválido**, (i) se o processamento não tiver sido concluído ou (ii) se alguma das condições de controlo para um processamento de teste de diagnóstico **válido** não estiver presente.

No caso de um processamento de teste de diagnóstico **inválido** repita o teste utilizando os restantes ácidos nucleicos purificados ou comece a partir das amostras originais novamente.

10.2 Interpretação dos Resultados

10.2.1 Análise Qualitativa

Canal de Detecção			Interpretação de Resultados
Cy ⁵	FAM TM	JOE TM	
+	-	+*	Foi detetado o ARN específico do NV G I.
-	+	+*	Foi detetado o ARN específico do NV G II.
-	-	+	Não foi detetado o ARN específico do NV G I nem do NV G II. A amostra não contém quantidades detetáveis do ARN específico do NV G I ou NV G II.
-	-	-	RT-PCR inibição ou falha ao nível do reagente. Repetir teste a partir da amostra original ou recolher e testar uma nova amostra.

* Não é necessária a deteção do Controlo interno (Internal control) no canal de deteção JOETM para resultados positivos no canal de deteção Cy⁵ ou no canal de deteção FAMTM. Carga(s) elevada(s) do ARN do NV G I e/ou NV G II na amostra pode causar a redução ou ausência de sinais de Controlo interno.

11. Avaliação do Desempenho

Dado que o norovírus não pode ser cultivado em cultura, não existe material padrão quantificado disponível. Por conseguinte, o desempenho avaliado do RealStar® Norovirus RT-PCR Kit 2.0 foi efetuado através da utilização de ARN extraído de um isolado do norovírus do genogrupo I (G I.3) e do ARN extraído do isolado do norovírus do genogrupo II (G II.4). O ARN extraído foi quantificado através do PCR em tempo real quantitativo utilizando transcrições *in vitro* quantificadas como padrões de quantificação para gerar uma curva padrão.

11.1 Sensibilidade Analítica

A sensibilidade analítica do RealStar® Norovirus RT-PCR Kit 2.0 define-se como a concentração (cópias por µl de eluato) de moléculas de ARN específico do norovírus que pode ser detetada com uma taxa de positividade de 95%. A sensibilidade analítica foi determinada através da análise de diluições seriadas do ARN extraído de um isolado do norovírus do genogrupo I e um isolado do norovírus do genogrupo II.

Tabela 1: Resultados da RT-PCR utilizados para o cálculo da sensibilidade analítica no que respeita à deteção de ARN específico do NV G I

Concentração inserida [cópias/µl]	Número de Réplicas	Número de Positivos	Taxa de Positividade [%]
10,000	24	24	100
3,162	24	24	100
1,000	24	24	100
0,316	24	22	92
0,100	24	17	71
0,032	16	6	38
0,010	16	0	0

Tabela 2: Resultados da RT-PCR utilizados para o cálculo da sensibilidade analítica no que respeita à deteção de ARN específico do NV G II

Concentração inserida [cópias/µl]	Número de Réplicas	Número de Positivos	Taxa de Positividade [%]
10,000	24	24	100
3,162	24	24	100
1,000	24	24	100
0,316	24	23	96
0,100	24	17	71
0,032	24	14	58
0,010	24	0	0

A sensibilidade analítica do RealStar® Norovirus RT-PCR Kit 2.0 foi determinada por análise Probit:

- Para a deteção de ARN específico do norovírus do genogrupo I, a sensibilidade analítica é de 0,33 cópias/µl eluato
- Para a deteção de ARN específico do norovírus do Genogrupo II, a sensibilidade analítica é de 0,25 cópias/µl eluato

11.2 Especificidade Analítica

A especificidade analítica do RealStar® Norovirus RT-PCR Kit 2.0 é garantida pela seleção meticulosa dos oligonucleotídeos (primers e sondas). Os oligonucleotídeos foram verificados pela análise de comparação das sequências com sequências publicamente disponíveis, para garantir que todos os genótipos relevantes do NV G I e G II serão detetados.

A especificidade analítica do RealStar® Norovirus RT-PCR Kit 2.0 foi avaliada através do teste a um painel de ADN e ARN extraído de diferentes isolados de Norovírus em conjunto com ADN/ARN extraído de diferentes agentes patogénicos gastrointestinais e flora comensal encontrados nos intestinos e nas fezes.

O RealStar® Norovirus RT-PCR Kit 2.0 não reagiu com nenhum dos seguintes patogénicos:

- Astrovirus
- Rotavirus
- Sapovirus
- Vírus de l'hépatite A
- Vírus de l'hépatite E
- *Cryptococcus spec.*
- *Entamoeba spec.*
- *Entamoeba histolytica*
- *Giardia lamblia*
- *Clostridium difficile*
- *Escherichia coli*
- *Salmonella spec.*
- *Campylobacter spec.*

11.3 Precisão

A precisão do RealStar® Norovirus RT-PCR Kit 2.0 foi determinada com base na variabilidade Intra-ensaio (variabilidade dentro de um ensaio), na variabilidade Inter-ensaio (variabilidade entre diferentes ensaios) e na variabilidade Inter-lote (variabilidade entre diferentes lotes de produção). A variabilidade total foi calculada através da combinação das três análises.

Os dados de variabilidade são expressos em termos de variação padrão e coeficiente de variação com base nos valores (C_t) de controlos positivos baixos (LDD tripartidos) para o Genogrupo I e Genogrupo II do norovírus e para o Controlo Interno (Internal Control). Foram analisadas oito réplicas por amostra e por ensaio.

Tabela 3: Dados de precisão para a deteção de ARN específico do NV G I e do NV G II

NV G I e NV G II		Ciclo limiar médio (C_t)	Desvio Padrão	Coefficiente de Variação [%]
Variabilidade Intra-ensaio	NV G I	33,92	0,80	2,36
	NV G II	29,89	0,45	1,50
Variabilidade Inter-ensaio	NV G I	33,74	0,79	2,34
	NV G II	30,12	0,42	1,39
Variabilidade Inter-lote	NV G I	36,05	0,46	1,29
	NV G II	33,33	0,32	0,96
Variabilidade Total	NV G I	35,10	1,29	3,66
	NV G II	31,40	1,55	4,95

Tabela 4: Dados de precisão para a deteção do Controlo Interno (Internal Control)

Controlo Interno (Internal Control)	Ciclo limiar médio (C_t)	Desvio Padrão	Coefficiente de Variação [%]
Variabilidade Intra-ensaio	22,06	0,07	0,34
Variabilidade Inter-ensaio	22,21	0,18	0,80
Variabilidade Inter-lote	22,13	0,14	0,63
Variabilidade Total	22,15	0,15	0,69

11.4 Avaliação Diagnóstica

A especificidade e a sensibilidade de diagnóstico do RealStar® Norovirus RT-PCR Kit 2.0 foram avaliadas através da análise de 100 espécimes norovírus positivos e 40 norovírus negativos de doentes com diarreia. Todos os espécimes foram pré-testados utilizando testes moleculares ou de imunodiagnóstico.

Tabela 5: Resultados da avaliação da sensibilidade e da especificidade de diagnóstico do RealStar® Norovirus RT-PCR Kit 2.0

		RealStar® Norovirus RT-PCR Kit 2.0	
		+	-
Método de referência	+	100	0
	-	0	40

12. Limitações

- A rigorosa conformidade com as instruções de utilização é necessária para resultados otimizados.
- A utilização deste produto está limitada a pessoal especialmente instruído e formado em técnicas de PCR em tempo real e em procedimentos de diagnósticos *in vitro*.
- A boa prática laboratorial é essencial para que este ensaio tenha um desempenho adequado. Deve-se ter um cuidado extremo para preservar a pureza dos componentes do kit e as configurações da reação. Todos os reagentes devem ser vigiados de perto para evitar impurezas e contaminação. Qualquer reagente duvidoso deve ser rejeitado.
- São necessários procedimentos de recolha, transporte, armazenamento e processamento adequados para o desempenho ideal deste teste.
- Este ensaio não pode ser utilizado diretamente no espécime. Devem ser realizados métodos apropriados de extração de ácido nucleico antes da utilização deste ensaio.
- A presença de inibidores RT-PCR (p.e. heparina) pode provocar falsos negativos ou resultados inválidos.
- A existência potencial de mutações nas regiões alvo do genoma do NV G I e NV G II abrangidas pelos primers e/ou sondas utilizados no kit poderá resultar na incapacidade de deteção da presença dos agentes patogénicos.
- Como em qualquer outro teste diagnóstico, os resultados do RealStar® Norovirus RT-PCR Kit 2.0 têm de ser interpretados tendo em consideração todas as conclusões clínicas e laboratoriais.

13. Controlo de Qualidade

De acordo com o Sistema de Gestão da Qualidade altona Diagnostics GmbH EN ISO 13485 certificado, cada lote de RealStar® Norovirus RT-PCR Kit 2.0 é testado face a especificações predeterminadas de modo a garantir uma qualidade do produto consistente.

14. Apoio Técnico

Para recomendações técnicas, contacte o nosso Apoio Técnico:

E-mail: support@altona-diagnostics.com

Telefone: +49-(0)40-5480676-0

15. Bibliografia

Versalovic, James, Carroll, Karen C., Funke, Guido, Jorgensen, James H., Landry, Marie Louise and David W. Warnock (ed). Manual of Clinical Microbiology. 10th Edition. ASM Press, 2011.

Cohen, Jonathan, Powderly, William G, and Steven M Opal. Infectious Diseases, Third Edition. Mosby, 2010.

16. Marcas Comerciais e Isenções de Responsabilidade

RealStar® (altona Diagnostics); ABI Prism® (Applied Biosystems); ATCC® (American Type Culture Collection); CFX96™ (Bio-Rad); Cy® (GE Healthcare); FAM™, JOE™, ROX™ (Life Technologies); LightCycler® (Roche); Maxwell® (Promega); Mx 3005P™ (Stratagene); NucliSENS®, easyMag® (bioMérieux); Rotor-Gene®, QIAamp®, QIASymphony® (QIAGEN); VERSANT® (Siemens Healthcare).

Os nomes registados, marcas comerciais, etc. utilizados neste documento, mesmo onde não estão especificamente marcados como tal, não devem ser considerados como estando desprotegidos pela legislação.

O RealStar® Norovirus RT-PCR Kit 2.0 é um kit de diagnóstico com a marcação CE de acordo com a Diretiva Europeia 98/79/EC relativa ao diagnóstico *in vitro*.

Produto não licenciado junto da Health Canada e não autorizado ou aprovado pela FDA.

Não disponível em todos os países.

© 2017 altona Diagnostics GmbH; todos os direitos reservados.

17. Explicação de Símbolos

	Dispositivo médico de diagnóstico <i>in vitro</i>
	Código do lote
	Cor cap
	Número do produto
	Índice
	Número
	Componente
	Número de identificação de comércio
	Consulte as instruções de utilização
	Contém o suficiente para "n" testes/reações (rxns)
	Limite de temperatura
	Data de validade
	Fabricante
	Atenção
	Nota
	Versão

Notas:

always a drop ahead.

altona Diagnostics GmbH
Mörkenstr. 12
22767 Hamburg, Germany

phone +49 40 548 0676 0
fax +49 40 548 0676 10
e-mail info@altona-diagnostics.com

www.altona-diagnostics.com

